

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08196280 A**(43) Date of publication of application: **06 . 08 . 96**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09**  
**C12N 1/21**  
**C12P 13/06**  
**// C12N 9/24**  
**(C12N 1/21 , C12R 1:15 )**

(21) Application number: **07012361**(22) Date of filing: **30 . 01 . 95**(71) Applicant: **AJINOMOTO CO INC**

(72) Inventor: **SUGIMOTO MASAKAZU**  
**OTONA KIYOKO**  
**NAGASE KAZUO**  
**TSUCHIYA MAKOTO**  
**MATSUI YUTAKA**  
**YOSHIHARA YASUHIKO**  
**NAKAMATSU WATARU**

(54) **SUCROSE GENE ORIGINATED FROM**  
**CORYNEFORM BACTERIUM AND ITS**  
**UTILIZATION**

(57) Abstract:

**PURPOSE:** To obtain the subject gene capable of increasing the sucrose-utilizing ability of a Coryneform bacterium and useful for obtaining an L-amino acid or nucleic acid in a good yield in a short time from raw materials containing the sucrose.

**CONSTITUTION:** This gene is originated from a Coryneform bacterium and codes a protein which has the amino acid sequence of the formula and which has a sucrase activity. The gene is obtained by a method described in Japanese unexamined patent HEI 5-244958, comprising producing a gene library from the chromosome DNA of the Coryneform bacterium, subjecting the gene library to a colony hybridization with a probe synthesized under the homology in the base sequence of the sucrase gene, selecting a sucrase activity-expressing colony as a sucrase gene-introducing strain from hybridized colonies, and subsequently obtaining a DNA fragment containing the sucrase gene from the cell of the strain.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

```

Met His Thr Glu Leu Ser Ser Leu Arg
Pro Ala Tyr His Val Thr Pro
1
10
15
Pro Gln Gly Arg Leu Asn Asp Pro Asn
Gly Met Tyr Val Asp Gly Asp
20
25
30
35
385
390
395
400
405
410
415
420
Phe Ala Phe Pro Gly Leu Gln Arg

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-196280

(43) 公開日 平成8年(1996)8月6日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	8828-4B		
1/21				
C 1 2 P 13/06				
// C 1 2 N 9/24				

9162-4B

C 1 2 N 15/ 00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平7-12361

(22) 出願日 平成7年(1995)1月30日

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 杉本 雅一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 乙名 聖子

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社生産技術研究所内

(72) 発明者 長瀬 和男

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社中央研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コリネホルム細菌由来のシュクラゼ遺伝子とその利用

(57) 【要約】

【構成】 コリネホルム細菌に由来し、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中に生成蓄積したL-アミノ酸又は核酸を採取する。

【効果】 本発明の方法によれば、シュクロース系原料から短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項2】 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA。

【請求項4】 請求項3記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌。

【請求項5】 請求項4記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

【請求項6】 L-アミノ酸がL-グルタミン酸、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-グルタミン酸、L-アルギニン、L-プロリンより成る群、核酸が5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアニル酸より成る群から選ばれる、請求項5記載のL-アミノ酸又は核酸の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、L-アミノ酸発酵や核酸発酵に用いられるコリネホルム細菌に由来するシュクラーゼ遺伝子、該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結して得られる組換えDNA、該組換えDNAを保有するコリネホルム細菌、及び該細菌を培養することによるL-アミノ酸又は核酸の製造方法に関する。

## 【0002】

【従来技術】 遺伝子操作技術を用いたL-アミノ酸生産菌の育種については従来より多くの研究がなされており、報告例も多数ある (Biotechnology Letters, Vol. 2, pp. 525-530 (1980)、Appl. Environ. Microbiol., Vol. 144, pp. 181-190 (1979)、日本農芸化学会昭和56年度大会講演要旨集, p. 8 (1981)など)。しかしながら、これらはいずれもL-アミノ酸生合成系の遺伝子を増強することによって目的とするL-アミノ酸の菌体あたりの生産性を高めるものであって、発酵原料である糖の資化性を高めることによって生産効率を高めるものではなかった。

【0003】 一方、遺伝子操作技術を用いてL-アミノ酸生産菌の糖の資化性を変化させた報告としては、エシェリヒア・コリにシュクロース資化能を与えた例がある (特開昭61-119185号及び特開平2-171178号公報参照)。すなわち、シュクロースを取り込み、それをグル

コース-6-リン酸とフラクトースに分解する活性をエシェリヒア・コリに与え、本来エシェリヒア・コリが資化できないシュクロースを炭素源としてできるようにしたものである。また、各種L-アミノ酸生産菌として有用なコリネホルム細菌については、特開平5-244958号において、シュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含む11.6 Kbpの大きさのDNA断片を取得したことが記載されているが、コリネホルム細菌内での当該遺伝子の発現については確認されておらず、シュクロースを原料とするL-アミノ酸や核酸の生産における当該遺伝子の増幅の効果は明らかでなかった。

## 【0004】

【本発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、コリネホルム細菌のシュクロースを資化する能力を増強することによりシュクロースを含む原料から短時間に効率よくL-アミノ酸又は核酸を製造する方法を提供することである。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、コリネホルム細菌由来のシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子の構造を明らかにし、当該遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターとの組換えDNAを取得し、L-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌に該組換えDNAを導入したところ、当該細菌がシュクロースを含む原料から従来より短い時間で収率良くL-アミノ酸又は核酸を生産できることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0006】 即ち、本発明は、(1) コリネホルム細菌由来で、配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するシュクラーゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子、(2) 配列表配列番号1に記載の塩基配列の2338番目から3609番目に至る塩基配列を有する上記(1)記載の遺伝子、(3) 上記(1)又は(2)に記載の遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターが連結されて得られる組換えDNA、(4) 上記(3)記載の組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌、及び、(5) 上記(4)記載のコリネホルム細菌をシュクロースを含む液体培地に培養し、培養液中にL-アミノ酸又は核酸を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-アミノ酸又は核酸の製造方法、を提供するものである。

【0007】 本発明にいうコリネホルム細菌とは、Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., p. 599 (1974)に記載されているように、好気性のグラム陽性桿菌であり、従来よりコリネバクテリウム属に分類されている細菌、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属細菌として統合された細菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、及びコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィ

バクテリウム属細菌やミクロバクテリウム属細菌を含むものであり、一般にL-グルタミン酸生産菌として知られている下記のような微生物である。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

プレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・インマリオフィラム

プレバクテリウム・ラクトファーメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

プレバクテリウム・ロゼウム

プレバクテリウム・サッカロリティカム

プレバクテリウム・チオゲニタリス

ミクロバクテリウム・アンモニオフィラム

【0008】具体的に例示すると、下記のようなL-グルタミン酸生産性の野生株及びその変異株、並びにこれらから誘導されるL-アミノ酸又は核酸生産株が挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965

プレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020

プレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067

プレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068

プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869

プレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825

プレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066

プレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240

ミクロバクテリウム・アンモニオフィラム ATCC15354

【0009】本発明においてシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子とは、シュクロースを加水分解しグルコースとフラクトースを生成する活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を指す。シュクラゼ活性は菌体がシュクロースを炭素源として利用する時に重要である。シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を取得するには、特開平5-244958号公報記載の方法によ

り、まず、コリネホルム細菌の染色体DNAより遺伝子ライブラリーを作成し、次いで他の微生物について公知となっているシュクラゼ遺伝子の塩基配列における相同性をもとに合成したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイズするコロニーのうちシュクラゼ活性を発現するものをシュクラゼ遺伝子導入株として選び出し、当該株の菌体からシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片として取得すればよい。

【0010】本発明において、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を連結するベクターとしては、コリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なものであれば特に制限はないが、通常コリネホルム細菌由来のプラスミドを用いればよい。具体的には、pH M1519 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、pAM330 (Agric. Biol. Chem., Vol. 48, pp. 2901-2903 (1984))、及びこれらをベースとした薬剤耐性プラスミド等である。また、相同組換えやインサージョンシーケンスを用いて上記遺伝子を染色体中に導入することも可能である。相同組換えについては、温度感受性複製起点を用いたコリネホルム細菌の染色体遺伝子組換え法があり (特開平5-7491号公報参照)、また、コリネホルム細菌由来のインサージョンシーケンスとしては、IS714、IS719、IS903等があり、これらを利用すればよい (WO93/18151号公報参照)。

【0011】シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とベクターとの組換えDNAを保有し、かつL-アミノ酸又は核酸の生産能を有するコリネホルム細菌は、L-アミノ酸または核酸生産能を有する株を宿主菌とし、これに当該組換えDNAを導入することにより取得することができる。宿主菌として使用できるコリネホルム細菌の具体例としては、例えばL-グルタミン酸生産菌の野生株及びその変異株、並びにL-グルタミン酸生産菌より誘導される各種L-アミノ酸生産株又は核酸生産株が挙げられる。L-グルタミン酸以外のL-アミノ酸としては、L-リジン、L-スレオニン、L-アスパラギン酸、L-イソロイシン、L-グルタミン、L-アルギニン、L-プロリン等コリネホルム細菌が生産可能なL-アミノ酸ならいずれでもよい。また、核酸としては5'-イノシン、5'-イノシン酸、5'-グアノシン、5'-グアニル酸等が挙げられる。

【0012】以下、各L-アミノ酸及び核酸の生産に好適な宿主の具体例を示す。

(1) L-グルタミン酸製造に好適な宿主

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806

コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC15990

コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965  
 プレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14020  
 プレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC14067  
 プレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068  
 プレバクテリウム・ラクトフェルメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム) ATCC13869  
 プレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825  
 プレバクテリウム・サッカロリチカム ATCC14066  
 プレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240  
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム ATCC15354  
 上記の野生株に加えて、これらから誘導された下記のような変異株も宿主として使用できる。  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12475 (FERM BP-2922) (特開平3-49690号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12476 (FERM BP-2923) (特開平3-49690号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ12477 (FERM BP-2924) (特開平3-49690号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12478 (FERM BP-2925) (特開平3-49690号)  
 【0013】(2) L-リジン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12031 (FERM BP-277) (特開昭60-62994号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ39134 (FERM BP-2923) (特開昭60-62994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3463 (FERM P-1987) (特公昭51-34477号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082 (NRRL B-11470, FERM P-3840) (特公昭59-4993号)  
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム AJ11094 (NRRL B-11472, FERM P-3856) (特公昭59-4993号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12435 (FERM BP-2294) (特開平6-7182号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12592 (FERM BP-3239) (特開平6-7182号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12593 (FERM BP-3240) (特開平6-7182号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12596 (FERM BP-3242) (特開平6-7182号)  
 【0014】(3) L-スレオニン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11188 (FERM P-4190) (特開昭60-87788号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11682 (FERM BP-118) (特公平2-31956号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ11683 (FERM BP-119) (特公平2-31956号)  
 【0015】(4) L-アスパラギン酸製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・フラバム AJ3859 (FERM P-2799)

(特開昭51-61689号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3860 (FERM P-2800) (特開昭51-61689号)  
 コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ3877 (FERM P-2803) (特開昭51-61689号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3876 (FERM P-2802) (特開昭51-61689号)  
 【0016】(5) L-イソロイシン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12404 (FERM P-10141) (特開平2-42988号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ12405 (FERM P-10142) (特開平2-42988号)  
 【0017】(6) L-アルギニン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・フラバム AJ12144 (FERM P-7642) (特公平5-27388号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12145 (FERM P-7643) (特公平5-27388号)  
 プレバクテリウム・フラバム ATCC21493 (特開平5-3793号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC21659 (特開平5-3793号)  
 【0018】(7) L-プロリン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11225 (FERM P-4390) (特開昭60-87788号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ11512 (FERM P-5332) (特公昭62-36679号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ11513 (FERM P-5333) (特公昭62-36679号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ11514 (FERM P-5334) (特公昭62-36679号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11522 (FERM P-5342) (特公昭62-36679号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ11523 (FERM P-5343) (特公昭62-36679号)  
 【0019】(8) L-ヒスチジン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・フラバム AJ3420 (FERM BP-2316) (特開平2-186994号)  
 プレバクテリウム・フラバム AJ12425 (FERM BP-2212) (特開平2-186994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12092 (FERM P-7273) (特開平2-186994号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12426 (FERM BP-2213) (特開平2-186994号)  
 【0020】(9) L-バリン製造に好適な宿主  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3434 (FERM P-1854) (特開昭63-258588号)  
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12341 (FERM BP-1763) (特開昭63-258588号)  
 コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3776 (FERM P-2601) (特開昭63-258588号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ12342 (FERM BP-1764) (特開昭63-258588号)

【0021】(10) L-ロイシン製造に好適な宿主  
プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3452 (FERM P-1965) (特開昭50-123877号)

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ3719 (FERM P-2517) (特開昭50-123877号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3453 (FERM P-1966) (特開昭50-123877号)

コリネバクテリウム・グルタミカム AJ3455 (FERM P-1968) (特開昭50-123877号)

【0022】(11) L-フェニルアラニン製造に好適な宿主

プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ12637 (FERM BP-4160) (特開平5-49489号)

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ11761 (FERM P-6286) (特公平2-11235号)

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12638 (FERM P-12382) (特公平2-11235号)

【0023】(12) L-グルタミンの製造に好適な宿主  
プレビバクテリウム・フラバム AJ12418 (FERM BP-2205) (特開平2-186994号)

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム AJ12419 (FERM BP-2206) (特開平2-186994号)

【0024】(13) 5'-イノシン酸の製造に好適な宿主

プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) ATCC6872

プレビバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス) AJ12192 (FERM P-7949) (特公平5-998号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11347 (FERM P-4968) (特公平57-22558号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11350 (FERM P-4971) (特公平57-22558号)

コリネバクテリウム・エクイ AJ11352 (FERM P-4973) (特公平57-22558号)

【0025】(14) 5'-グアニル酸の製造に好適な宿主

コリネバクテリウム・エクイ ATCC21280

【0026】組換えDNAをコリネホルム細菌に導入する方法には特に制限はないが、通常よく用いられるプロトプラスト法 (Gene, Vol. 39, pp. 281-286 (1985))、電気パルス法 (特開平2-207791号) 等の方法を用いればよい。

【0027】かくして得られる組換えDNAを保有するコリネホルム細菌を培養する方法は、従来のL-アミノ酸生産菌又は核酸生産菌の培養方法と特に変わらない。すなわち、培地としては炭素源、窒素源、無機イオン、更に必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養

素を含有する通常のものが用いられる。炭素源としては、グルコース、シュクロース及びこれを含有する澱粉加水分解液、糖蜜等の糖類、酢酸等の有機酸類、エタノール等のアルコール類、又はこれらの混合物など、従来コリネホルム細菌の培養に用いられているものが使用できる。しかしながら、本発明の組換えDNAを保有するコリネホルム細菌は、シュクロースからL-アミノ酸又は核酸を生産する能力が顕著に向上しているため、炭素源としてシュクロースを含む培地で培養を行う際に本発明の効果が特に顕著となる。すなわち、ケーンモラセス、ピートモラセス等のシュクロースを含有する原料を使用して発酵を行うと、従来のコリネホルム細菌に比べて目的とするL-アミノ酸又は核酸の生産速度が大いに増大する。窒素源としては、アンモニアガス、アンモニア水、アンモニウム塩その他が使用できる。なお、アミノ酸、ビタミン等の栄養要求性変異株を宿主に使用する場合には、その株が要求する栄養素を培地に適宜加える必要がある。

【0028】培養は、好氣的条件下で行うのがよく、培養温度を24~42℃、pHを5~9に制御しつつ、培養液中へのL-アミノ酸又は核酸の生成蓄積が実質的に終了するまで行われる。pHの調整には、無機あるいは有機の酸性あるいはアルカリ性物質、更には尿素、炭酸カルシウム、アンモニアガス等が使用される。かくして培養を行うことにより培養液中に著量のL-アミノ酸又は核酸が生成蓄積される。蓄積されたL-アミノ酸又は核酸は、晶析、イオン交換樹脂処理等公知の方法を組合せることにより培養液中より適宜採取することができる。

【0029】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づいて更に詳細に説明する。

【0030】実施例1 (シュクラゼ遺伝子のプレビバクテリウム・ラクトファーメンタムへの導入と発現)

特開平5-244958号記載の方法により、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム由来のシュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片を挿入したプラスミドpBS3-43を取得し、更に当該DNA断片をエシェリヒア・コリとコリネホルム細菌のシャトルベクターpSAC4に連結させたプラスミドpSSM30を構築した。pSSM30を保有させたエシェリヒア・コリ JM109の菌体からpSSM30を開製し、電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) によってプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869を形質転換した。pSSM30を保持するATCC13869株 (以下、ATCC13869/pSSM30と記す) を100mlのCM2G培地 (酵母エキス10g/l、ポリペプトン10g/l、グルコース5g/l、NaCl5g/l、pH7.0) で培養し、菌体を遠心分離により回収し洗浄後、超音波処理によって破碎し、10万Gの遠心力で分画した上澄を得た。この上澄150μlと0.5Mシュクロース溶液50μlを混合し、30℃にて30分反応を行った。ついで100℃で3分間加熱して反応

を停止させ、反応液中に生成したグルコースをグルコースCテストワコーによって定量することによりシュクラゼ活性を測定した。なお、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869はもともと菌体内にシュクラゼ活性を持っているため、比較のためpSSM30のベクター部分であるpSAC4のみを保持するATCC13869株 (ATCC 13869/pSSM30) についても同様に測定を行った。

【0031】結果を表1に示す。シュクラゼの活性の単位は、1時間に1mgのグルコースを生成する活性を1 unitとし、粗酵素液中の蛋白質1mgあたりの活性として表示した。表1から明らかなように、pSSM30を導入した株は明らかにシュクラゼ活性が増強されていることが確認された。

【0032】

【表1】

菌 株	シュクラゼ活性 (units)
ATCC13869/pSSM30	5.7
ATCC13869/pSAC4	0.72

【0033】なお、pSSM30を保有させたエシェリヒア・コリ JM109は、AJ13047と命名され、平成6年9月14日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にプラベスト条\*

\* 約に基づく寄託がなされており、受託番号FERM BP-4800が付与されている。

【0034】実施例2 (シュクラゼ遺伝子の塩基配列の決定)

pBS3-43に挿入されたDNA断片のうち、約6kbのSma I断片と、それに含まれるシュクラゼ遺伝子の上流方向に約1 kbについて、蛍光標識法により塩基配列を決定した。この配列を配列表配列番号1に示す。本配列にはオープン・リーディング・フレームが4個存在しているが (ORF-F1: 342~1505、ORF-F2: 2338~3609、ORF-F3: 4438~5358、ORF-F4: 5570~6577)、既知のシュクラゼ遺伝子との相同性比較により、プレビバクテリウム・ラクトファーマンタムのシュクラゼの構造遺伝子は、配列番号1の2338番目から3609番目に至る塩基配列から成るORF-F2であり、424個のアミノ酸残基から成る蛋白質をコードするものと推定された。また、ORF-F1、ORF-F3及びORF-F4について蛋白質のデータベースNBRFにより相同性検索を行ったところ、表2に示す結果を得た。ORF-F3とORF-F4については既知の蛋白質と高い相同性が見いだされ、それらの間に関係があると考えられる。

【0035】

【表2】

ORF No.	アミノ酸数	相同性のある既知の蛋白質	相同性(%)
F1	388	N-アセチルグルコサミン-6リン酸デアセチラーゼ 由来: エシェリヒア・コリ アミノ酸数: 382	24
F3	307	UDP-N-アセチルムラモイルアラニル-D-グルタミル-メソ-6チアミノピメリン酸シンセターゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 494	36
F4	336	ホスホ-N-アセチルムラモイルペンタペプチドトランスフェラーゼ 由来: パチルス・サチルス アミノ酸数: 324	39

【0036】実施例3 (シュクラゼ遺伝子を含むプラスミドのL-リジン生産菌への導入とL-リジン生産への影響)

エシェリヒア・コリ AJ 13047の菌体からプラスミドpSSM30を調製し、L-リジン生産菌であるプレビバクテリウム・ラクトファーマンタム AJ11082 (NRRL B-11470) に電気パルス法を用いて導入した。形質転換体を5 µg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート (グルコース5g/l、ポリペプトン10g/l、酵母エキス10g/l、NaCl5g/l、DL-メチオニン0.2 g/l、寒天15 g/l、pH7.2) 上にて選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をAJ11082/pSSM30と命名した。

【0037】AJ11082及びAJ11082/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、L-リジンの発酵生産を行なった。1 l容ジャーファーマンターに入れた表3に示す組成のリジン生産用培地300 mlに各菌株を接種し、培養※50

※温度31.5℃でアンモニアガスにてpHを7.0に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュクロース濃度が1~3g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8g/dlの硫酸アンモニウムの混合溶液を連続的にフィードし、フィード液150mlを消費し終わるまで培養を行なった。培養時間とL-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクラゼ活性を測定した結果を表4に示す。シュクラゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-リジンの発酵生産速度が大幅に向上した。また、遺伝子導入株では菌体内のシュクラゼ活性が増強されていることが確認された。

【0038】

【表3】

成 分	濃 度
シュクロース	100 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	55 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g/l
大豆蛋白質加水分解物	50 ml/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg/l
ニコチン酸アミド	5 mg/l

菌 株	培養時間 (hr)	Ｌ-リジン蓄積 (g/dl)	シュクラーゼ 活性 (units)
AJ11082	65	9.5	0.35
AJ11082/pSSM30	34	9.4	3.54

【0040】実施例4（シュクラーゼ遺伝子プラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーメンタム野生株への導入とＬ-グルタミン酸生産への影響）

実施例3と同様にして、シュクラーゼ遺伝子を含むプラスミドpSSM30をプレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869に導入した。形質転換体を5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて選択し、形質転換体を取得した。取得した形質転換体をATCC

13869/pSSM30と命名した。

【0041】 ATCC13869及びATCC13869/pSSM30をシュクロースを含む培地にて培養し、Ｌ-グルタミン酸の発酵生産を行なった。1 l容ジャーファーメンターに入れた表5に示す組成のグルタミン酸生産用培地300mlに各菌株を接種し、培養温度31.5℃でアンモニアガスにてpHを6.5に調整しつつ通気攪拌培養を行なった。初発に加えたシュクロースを消費し尽くした後は、培養液中のシュクロース濃度が1～3 g/dlの範囲にコントロールされるように別に殺菌した60g/dlのシュクロースと8 g

【0042】

【表5】

成 分	組 成
シュクロース	100 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5 g/l
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.4 g/l
大豆蛋白質加水分解物	50 ml/l
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10 mg/l
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 mg/l
サイアミン-HCl	350 μg/l
ビオチン	3.5 μg/l

【0043】

【表6】

【0039】

【表4】

菌 株	培養時間 (hr)	Ｌ-リジン蓄積 (g/dl)
ATCC13869	45	10.7
ATCC13869/pSSM30	29	10.9

【0044】実施例5（シュクラーゼ遺伝子断片の縮小化）

pSSM30中のシュクロース代謝速度向上に必須な領域を特定するため、挿入DNA断片の縮小化を行なった。遺伝子配列よりシュクラーゼ遺伝子を含むと予想される配列表の2157塩基目より存在するSacIIサイトより3724塩基目より存在するBan I サイトまでの領域を含む1.5kbのDNA断片をpSSM30より抽出し、両端を平滑末端化した後、エシエリヒア・コリ用ベクターpHSG399のSma I サイトに挿入した。更に、プレバクテリウム中で複製可能なプラスミドとするため、プレバクテリウムのプラスミドの複製起点の導入を行なった。プレバクテリウムの複製起点を有するプラスミドpHC4（特開平5-7491号参照）より3 kbの複製起点DNA断片を抽出し、両端の制限酵素部位をリンカーの連結によりBan H I サイトに改変した後、1.5 kbの上記DNA断片が連結されたpHSG399のBan H I サイトに挿入した。作製したプラスミドをpSSM30BSと命名した。

【0045】実施例6（縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドのＬ-リジン生産菌への導入とＬ-リジン生産への影響）

縮小型シュクラーゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをＬ-リジン生産菌であるプレバクテリウム・ラクトファーメンタム AJ11082 (NRRL B-11470)に電気パルス法を用いて導入した。5 μg/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、AJ11082/pSSM30BSと命名した。

【0046】実施例3と同様にして、AJ11082及びAJ11082/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、Ｌ-リジンの発酵生産を行なった。培養時間とＬ-リジン蓄積量、及び培養終了後の菌体より常法に従って調製した粗酵素液のシュクラーゼ活性を測定した結果を表7に示す。シュクラーゼ遺伝子の導入により、シュクラーゼ



活性が増強され、シュクロースからのL-リジンの発酵生産速度が大幅に向上した。

\* 【0047】

\* 【表7】

菌 株	培養時間 (hr)	L-リジン蓄積 (g/dl)	シュクラゼ活性 (units)
AJ11082	67	9.9	0.39
AJ11082/pSSM30BS	35	9.5	4.10

【0048】実施例7（縮小型シュクラゼ遺伝子プラスミドのプレバクテリウム・ラクトファーマンタム野生株への導入とL-グルタミン酸生産への影響）

縮小型シュクラゼ遺伝子プラスミドpSSM30BSをプレバクテリウム・ラクトファーマンタム ATCC13869に電気パルス法を用いて導入した。5  $\mu$ g/mlのクロラムフェニコールを含むM-CM2Gプレート上にて形質転換体を取得し、ATCC13869/pSSM30BSと命名した。

【0049】実施例4と同様にして、ATCC13869及びATCC13869/pSSM30BSをシュクロースを含む培地にて培養し、L-グルタミン酸の発酵生産を行なった。培養時間とL-グルタミン酸蓄積量を表8に示す。シュクラゼ遺伝子の導入により、シュクロースからのL-グルタミン酸の発酵生産速度が大幅に向上した。

【0050】

【表8】

菌 株	培養時間 (hr)	L-グルタミン酸蓄積 (g/dl)
ATCC13869	43	10.2
ATCC13869/pSSM30BS	30	10.3

【0051】

【発明の効果】コリネホルム細菌に由来し、シュクラゼ活性を持つ蛋白質をコードする遺伝子を含むDNA断片とコリネホルム細菌内で遺伝子増幅可能なベクターを連結して得られる組換えDNAを、L-アミノ酸又は核酸生産能を有するコリネホルム細菌に導入し、該細菌を※

※シュクロースを含む液体培地に培養する本発明の方法によれば、シュクロースから短時間に効率的にL-アミノ酸又は核酸を製造することができる。

【0052】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：6911

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

20 生物名：プレバクテリウム・ラクトファーマンタム

株名：ATCC13869

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：342..1505

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：2338..3609

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

30 存在位置：4438..5358

特徴を決定した方法：P

特徴を表す記号：CDS

存在位置：5570..6577

特徴を決定した方法：P

配列

```

AGTCCGTCGA CGCCACCATT GATGTGGTGG TCA
CCGAGCT TGC GGAGGCT TTCTACATCT 60
ACGCTCCCGT CGGCGTGGAG TGGGGTCATT ACG
GGTGGGA TCACGCCGGT GAAAGTTGCG 120
GAACCCATGG TGTTCCTTGT GGGTTGAGGG AAC
GAGTGCG GGTGAGAAGT TTTTCAAGTG 180
TCTGCAAGTTT TTAAGTTATG CATCATCAGC TTG
GAAGGCT GAGGTAATTC AGTAGACCTG 240
CAACAGCAGG CCTCAAGTCC GAAGATAATT AAC
CTAGATC CGTAGACATA AGACATCATA 300
CGTCCTATGC TTGCTGGAAG GAACCAAATA ACC
TCAGAAA GATGGCAGAA GTGGTGCATT 360
ATCAAGAAAA TGCAGGTCAA GCAGTTAAAA AAA
TTGAGGG AAGAATTGTT CCCCCCTCG 420
GGGTGATTGA TGGCTTCTC CAACTCGAAA ACG

```

15

16

GCATCAT CACGGAACCTC TCTGGAGAAC 480  
 CAGCACCTAA AAACGCAGGA TTCCACCCCG AAC  
 TCCCCAC GATTGTTCCC GGTTTTATTG 540  
 ATCTTCATAA TCACGGTGGA AACGGTGGCG CGT  
 TTCCTAC GGAACGCGAG GACCAGGCGA 600  
 GGAACACCGC GCAGTATCAC CGCGAACATG GCA  
 CGACCGT GATGTTGCCA AGCATGGTTT 660  
 CGGCGCCGGC TGACGCACTG GCAGCGCAGG TGG  
 AAAACCT TATTCCCTTG TGTGAAGAGG 720  
 TCCTGCTGTG CGGCATTAC CTCGAGGGCC CTT  
 TCATCAA CGCATGCCGT TGTGGTGCTC 780  
 AAAACCCGGA TTTCATTTTT CCCGGCAACC CAA  
 CAGATCT TGCCCGGGTG ATCCATGCGG 840  
 GAAAAGGTTG GATCAAATCG ATCACAGTAG CGC  
 CGGAAAC TGACAATCTT TCTGAGCTTC 900  
 TCGATCTCTG CGCAGCGCAC CACATCATTG CTT  
 CCTTCGG GCACACTGAT GCAGATTTTG 960  
 ATACCACTAC CAGCGCAATT GCCTTGGCTA AAG  
 AGAAAAA TGTGACGGTC ACGGCTACGC 1020  
 ATTTGTTCAA TGCATGCCT CCGCTGCATC ATA  
 GGGCTCC CGGCAGCGTG GGCGCTTTGC 1080  
 TTGCTGCGGC ACGTGCCGGG GACGCATATG TTG  
 AGTTGAT CGCCGACGGC GTGCATTTGG 1140  
 CCGATGGAAC GGTCGATCTA GCTCGTTCCA ACA  
 ACGCCTT TTTCATCACG GACGCCATGG 1200  
 AAGCCGCCGG AATGCCAGAC GGTGAGTACA TTT  
 TGGGCGT TTTGAACGTC ACCGTCACCG 1260  
 ATGGAGTCGC CCGTCTGCGC GATGGCGGCG CCA  
 TCGCCGG GGGCACCAGC AACTAGCGA 1320  
 GTCAGTTCTG GCACCACGTG CGCAGGGGTA TGA  
 CGCTTAT CGACGCGACC CTCCACACCT 1380  
 CAACCGTCGC CGCTAAAATT CTCGGTCTTG GCG  
 ATCACGA AATCGCTAAA TCCAACCCTG 1440  
 CAAATTTTGT GGTCTTTGAC TCAAACGGCC AGG  
 TGCAAAA GGTCCATTTA GGTCATCAAG 1500  
 TACTTTAAGT ACGAGTAAAA CTATCCTGAT TTT  
 AAAGGAG TCCCACCATG GAAATCACTA 1560  
 TCTGCAAAGA CGAGCAAGAA GTCGGCAAAG CAG  
 TTGCAGT CCTAATCGCA CCCTTCGCCA 1620  
 ACAAGGGTGG AACCTTGGGG CTTGCAACAG GAT  
 CCTCACC ACTGAGTACC TACCAAGAGC 1680  
 TCATTTCGCAT GTATGAAGCT GGGGAAGTGT CAT  
 TCAAGAA CTGCAAGGCA TTCTTGTTGG 1740  
 ATGAATACGT GGGACTAACC CGTGACGATG AAA  
 ACAGCTA CTTTAAAACC ATTCGCAAAG 1800  
 AGTTCACCTGA CCACATCGAC ATCGTTGATG AAG  
 AGGTCTA CAGCCCAGAT GGTGCAAACC 1860  
 CTGATCCATA CGAAGCAGCT GCAGAGTATG AGG  
 CAAAGAT CGCTGCAGAA TCCGTTGAAG 1920  
 TTCAAATCCT TGGCATCGGC GGAAACGGCA CAT

17

18

CGCTTTC ATTGAACCAT CATCTTCTCT 1980  
 GTCAGGACTG ACAAAGGTCC AGGCGCTGCA CCC  
 TAAAACT GTGGAGGACA ACGCTCGATT 2040  
 CTTCAACACC ATCGAAGAGG TCCCAACCCA CGC  
 CGTCACC CAGGGTTTGG GCACTTTGTC 2100  
 CCGCGCGCAA AACATCGTGT TGGTGGCAAC TGG  
 TGAAGGA AAAGCCGACG CCATCCGCGG 2160  
 AACTGTGGAA GGCCAGTGA CTGCTTCTTG CCC  
 AGGTTCC ATCCTGTAGA TGCACAACAT 2220  
 GCCACCATCA TCGTTGGATG AAGCAGCAGT ATC  
 CAAGCTG GAAAACGCTG ATCACTACCG 2280  
 TCTCATGGAG CAATTAAAGC TGCGCTAGAA ACA  
 AAAAGGA AAGTACTGTG TGGGGCTATG 2340  
 CACACAGAAC TTTCCAGTTT GCGCCCTGCG TAC  
 CATGTGA CTCCTCCGCA GGGCAGGCTC 2400  
 AATGATCCCA ACGGAATGTA CGTCGATGGA GAT  
 ACCCTCC ACGTCTACTA CCAGCACGAT 2460  
 CCAGGTTTCC CCTTCGCACC AAAGCGCACC GGC  
 TGGGCTC ACACCACCAC GCCGTTGACC 2520  
 GGACCGCAGC GATTGCAGTG GACGCACCTG CCC  
 GACGCTC TTTACCCGGA TGCATCCTAT 2580  
 GACCTGGATG GATGCTATTC CGGTGGAGCC GTA  
 TTTACTG ACGGCACACT TAAACTTTTC 2640  
 TACACCGGCA ACCTAAAAAT TGACGGAAAG CGC  
 CGCGCCA CCCAAAACCT TGTCGAAGTC 2700  
 GAGGACCCAA CTGGGCTGAT GGGCGGCATT CAT  
 CGCCGTT CGCCTAAAAA TCCGCTTATC 2760  
 GACGGACCCG CCAGCGGTTT CACACCCCAT TAC  
 CGCGATC CCATGATCAG CCCTGATGGT 2820  
 GATGGTTGGA ACATGGTTCT TGGGGCCCAA CGC  
 GAAAACC TCACCGGTGC AGCGGTTCTA 2880  
 TACCGCTCGA CAGATCTTGA AAAGTGGGAA TTC  
 TCCGGTG AAATCACCTT TGACCTCAGT 2940  
 GATGCACAAC CTGGTTCTGC TCCTGATCTC GTT  
 CCCGATG GCTACATGTG GGAATGCCCC 3000  
 AACCTTTTTA CGCTTCGCGA TGAAGAACT GGC  
 GAAGATC TCGACGTGCT GATTTTCTGT 3060  
 CCACAAGGAT TGGACCGAAT CCACGATGAG GTT  
 ACTCACT ACGCAAGCTC TGACCAAGTGC 3120  
 GGATATGTCG TCGACAAGCT TGAAGGAACG ACC  
 TTCCGCG TCTTGCGAGG ATTCAGCGAG 3180  
 CTGGATTTCG GCCATGAATT CTACGCACCG CAG  
 GTTGCAG TAAACGGTTC TGATGCCTGG 3240  
 CTCGTGGGCT GGATGGGGCT GCCCGCGCAG GAT  
 GATCACC CAACAGTTGC ACAGGAAGGA 3300  
 TGGGTGCACT GCCTGACTGT GCCCCGCAAG CTT  
 CATTTGC GCAACCACGC GATCTACCAA 3360  
 GAGCTCCTTC TCCCAGAGGG GGAGTCGGGG GTA  
 ATCAGAT CTGTATTAGG TTCTGAACCT 3420  
 GTCCGAGTAG ACATCCAGG CAATATTTCC CTC

19

20

GAGTGGG ATGGTGTCCG TTTGTCTGTG 3480  
 GATCGTGATG GTGATCGTCG CGTAGCTGAG GTA  
 AAACCTG GCGAATTAGT GATCGCGGAC 3540  
 GATAATACAG CCATTGAGAT AACTGCAGGT GAT  
 GGACAGG TTTCAATTCGC TTTTCCGGGC 3600  
 CTTCAAAGGT GACACTATTG AGAGATAAGT CAT  
 ATAAAAG GGTCTTTTGT GGC GAATTGT 3660  
 ACAAATACTT CGCAAAATCC CTTGATCTAG TTA  
 TTGTCAC TGATGACAAC CCTCGTTCAG 3720  
 AGGTGCCTGC CACGATTCGC GCAGCAGTCA CTG  
 CAGGAGC ACAGCAGGGT GCTTCAGAGT 3780  
 CCGAACGACC GGTGGAAGTC CTAGAAATTG GTG  
 ACCGTGC AGAAGCAATT CGCGTTTTTG 3840  
 TCGAGTGGGC ACAGCCTGGA GATGGCATTG TAG  
 TAGCTGG AAAAGGCCAT GAAGTTGGAC 3900  
 AACTAGTTGC TGGTGTCCACC CACCATTTTG ATG  
 ACCGCGA AGAAGTTTCG GCTGCTTTGA 3960  
 CAGAAAAGCT CAACAATAAA CTTCCCCTTA CTA  
 CGGAAGA AGGATAGGCC ACAGTCATGA 4020  
 TCACAATGAC CCTTGGGGAA ATCGCTGACA TCG  
 TTGGAGG CAGGCTTACT GCGGGTGCTC 4080  
 AAGAAGATAC GCTTGTGAGC TCCAGCGTGG AAT  
 TTGATTG TCGATCCCTC ACACCGGGTG 4140  
 GCTTGTTTTT AGCACTTCCG GGTGCTCGTG TAG  
 ACGGGCA TGATTTTGTCT GCAACTGCAA 4200  
 TTGAGAAAGG TGCGGTCGCA GTATTGGCAG CCC  
 GTGAGGT TGACGTACCT GCGATCGTCG 4260  
 TGCCTCCAGT AAAAATCCAG GAATCCAATG CTG  
 ACATTTA TGCTCATGAT CCAGATGGGC 4320  
 ATGGCGCGGC GGTAGTGGAG GCGTTGGTCT CGG  
 TTGGCTC GCCACGTGGT GGATATCTGC 4380  
 GTGGATGGCC ATCAATTGAA CGTTGTGGCT ATT  
 ACTGGTT CTGTGGGAAA GACTTCTATG 4440  
 AAGGATTTCA TCGCGACGGT TCTTGGCCAA GAT  
 GGGCCAA CTGTGGCTCC TCCGGGCTCG 4500  
 TTAAACAATG AGCTTGGTTT GCCACACACC GCG  
 CTCCGCT GCACAACCGA TACTAAGTAT 4560  
 TTGGTGGCTG AGATGTCCGC GCGTGGCATT GGA  
 CATATTA AGCACCTGAC AGAGATTGCT 4620  
 CCGCCACGGA TTGCAGCTGT GCTCAACGTC GGC  
 CATGCGC ACCTGGGTGA ATTTGGATCC 4680  
 CGCGAGAATA TCGCGCAGGC AAAAGGCGAG ATC  
 ATTGAAG CGCTGCCCTC GAAGAAAACG 4740  
 GGTGGGGTAG CAGTCCTTAA CGCTGACGAT CCT  
 TTTGTCTG CCCGGATGGC TCCACGCACT 4800  
 AAGGCGCGCG TGGTGTGGTT TACCACCGAT GCA  
 GGTCAAG CAAAAAAGTC TGATTATTGG 4860  
 GCAACGAGTA TTCACTGGA CGCTGTTGCG CGG  
 GCAAGCT TTACGCTGAA CACGAAGGAC 4920  
 GGGTCTTGGC CGGTCTCCCT GCAGGTTTTT GGT

21

22

GAGCACC AGGTTGCTAA TGCACCTTGCT 4980  
GCTGCTGCCA TTGCCATGGA AGCTGGCGTC GCC  
CCAGAAT TGGTGGTTGC TGGATTGGAA 5040  
GCACATTCAG CGGCTTCCGC GCACCGCATG GAT  
GTAAAGA CCCGCGCCGA CGGCGTGACC 5100  
ATCATCAACG ATTCTTACAA CGCGAATCCT GAT  
TCTATGC GTGCAGGTAT CGCGGCTCTT 5160  
GCGTACACAG CTAGTGGTCG TTCTCTGAAG CAA  
CAAGCTG GGCAGTGCTT GGTCAAATGG 5220  
GTGAGCTTGG CGATGACGCC TCGGAAGCCC ATG  
CCGAACT TGGTGCTGAG CTGCCTAAAT 5280  
ACAATGTTCA AGAACTTGTC GCAGTGGGGG AGA  
ACCCTAC CTGTGCAGCA CTTGCAGAGT 5340  
CCGCAGCGAG CCTGGGTGTG AGTACTCACG TAG  
TTTCAGA CGTTGATGCA GCGCTCGAGT 5400  
TGCTCGCAGC CCATATTAAG CGGGATGATG TAG  
TGCTGGT TAAGGCTTCA AATGCTGATC 5460  
GCCTGTGGAG GGTCGCAGAA GCACTACATG GCA  
TGGTGCC GGCCTCAAAA ACACAGGTGG 5520  
CTCGGTCAAC GACGATTCTC GTCGGAACGT GGA  
AGGACAG TAGAAAACAA TGCAACAGAT 5580  
TATGGTCAGT GGAACGGTTG CGTTCCTCGT CTC  
AATCTTT CTCACCCCGG TGTTGATCCG 5640  
TTATTTCACT AACCGCCAGT TGGGCCAGGA AAT  
CCGTGAA GAAGGCCTGC AGTCTCACTT 5700  
GCGTAAGCGT GGCACCTCAA CCATGGGTGG CAT  
TGCGATT ATCGCGGGCA TTGTTGTGGC 5760  
CTATGTGTTT ACCAATATCT TGGCCATGAT CCA  
AGGCGTT GGTGGATTCA CAGTCTCCGG 5820  
CTTGCTCGTG TTGGGTCTGA CCTTGGGCCT TGG  
TGCCACT GGCTTCGCCG ATGACTTCAT 5880  
CAAGCTGTAC ATGAACCGAA ACCTTGGTTT GAA  
CAAGACC GCTAAGCTGG TGTCTCAGCT 5940  
GGCCATTGCG TTGATCTTTG GTTTTTTGGT ACT  
GCAGTTT CCCGATGAAA ACGGTCTGAC 6000  
CCCAGCATCA ACCACCTGT CATTCAATCG CGA  
TATCGAC ACCATTGACC TTGGCTTCGG 6060  
GGACAGCGTT TTTGGCATCA TCGTGTTCTT CAT  
TTTTATC TACGTTGTGG TCAGCGCGTG 6120  
GTCGAATGCC GTGAACATCA CTGATGGTTT GGA  
TGGTTTG GCTGCAGGTA CCACAGCATT 6180  
TGTCATGGGT GCTTACACCT TGATCACGTT CTG  
GCAGTTC CGAAACTCCT GCGATACTGC 6240  
AGTGGAAGCG GGTGCAATA CGGTGCGTGA TCC  
ACTGGAT TTGTCTGTGT TGTGCGCTGC 6300  
TGGTCTGGCG CCACCTTGGG CTTTCTGTGG TGG  
AATGCGG CACCGACAAA GATCTTCATG 6360  
GGCGATACTG GTTCTTTGGC ACTGGGCGGT TTG  
GTTGCAG GTATTTCTGT GGTAGCCGC 6420  
ACCGAGCTGC TCATGGTAT CATCGGCGCG CTG

23

24

TTTGTCA TTGAGGTCGC TTCTGTTGCG 6480  
 ATCCAGATCG GCGTGTTTAA GACCCGCGGT AAG  
 CGTGTGT TCAAAATGGC TCCGATCCAC 6540  
 CACCACTTCG AGGCCCTTGG GTGGACTGAA ACT  
 ACCGTGA CCATCCGTTT CTGGCTGATC 6600  
 ACGATCATGA CTGTGTTGGC GGGTGTGCGT GTG  
 TTTAACA GCGACTGGCT CCACTTAGCG 6660  
 GAGGTATAAA TAATTATGGT TTCTCTGTCC CAT  
 TTACCTC AGGCGCTGCA GGGCCGTATT 6720  
 CTTGTGGCCG GCGCTGGTGT TTCCGGCCTG TCC  
 ATAGCAA AGATGCTCAG TGAGTTGCAT 6780  
 TGCGATGTTG TGGTCACCGA CGAGAACGAA ACT  
 GCACGTC ACATGCTCAT TGAAGTAGTA 6840  
 GACGTTGCAG ATATCAGCAC CGCCCAGGCT CAG  
 GAACAGC TGGATTCTTT CTCCATTGTG 6900  
 GTCACCTCCC C

【0053】配列番号：2

\* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：424

配列の種類：蛋白質

配列の型：アミノ酸

\*

配列

Met	His	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	
Pro	Ala	Tyr	His	Val	Thr	Pro			
1				5					
10					15				
Pro	Gln	Gly	Arg	Leu	Asn	Asp	Pro	Asn	
Gly	Met	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp			
			20					25	
				30					
Thr	Leu	His	Val	Tyr	Tyr	Gln	His	Asp	
Pro	Gly	Phe	Pro	Phe	Ala	Pro			
			35					40	
				45					
Lys	Arg	Thr	Gly	Trp	Ala	His	Thr	Thr	
Thr	Pro	Leu	Thr	Gly	Pro	Gln			
			50			55			
				60					
Arg	Leu	Gln	Trp	Thr	His	Leu	Pro	Asp	
Ala	Leu	Tyr	Pro	Asp	Ala	Ser			
65					70				
			75					80	
Tyr	Asp	Leu	Asp	Gly	Cys	Tyr	Ser	Gly	
Gly	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Gly			
				85					
			90						
Thr	Leu	Lys	Leu	Phe	Tyr	Thr	Gly	Asn	
Leu	Lys	Ile	Asp	Gly	Lys	Arg			
			100					105	
				110					
Arg	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu	Val	Glu	Val	
Glu	Asp	Pro	Thr	Gly	Leu	Met			

25  
 105  
 115  
 Gly Gly Ile His Arg Arg Ser Pro Lys  
 Asn Pro Leu Ile Asp Gly Pro  
 120 125  
 130  
 Ala Ser Gly Phe Thr Pro His Tyr Arg  
 Asp Pro Met Ile Ser Pro Asp  
 135 140  
 145 160  
 Gly Asp Gly Trp Asn Met Val Leu Gly  
 Ala Gln Arg Glu Asn Leu Thr  
 165  
 170 175  
 Gly Ala Ala Val Leu Tyr Arg Ser Thr  
 Asp Leu Glu Asn Trp Glu Phe  
 180 185  
 190  
 Ser Gly Glu Ile Thr Phe Asp Leu Ser  
 Asp Ala Gln Pro Gly Ser Ala  
 195 200  
 205  
 Pro Asp Leu Val Pro Asp Gly Tyr Met  
 Trp Glu Cys Pro Asn Leu Phe  
 210 215  
 220  
 Thr Leu Arg Asp Glu Glu Thr Gly Glu  
 Asp Leu Asp Val Leu Ile Phe  
 225 230  
 235 240  
 Cys Pro Gln Gly Leu Asp Arg Ile His  
 Asp Glu Val Thr His Tyr Ala  
 245  
 250 255  
 Ser Ser Asp Gln Cys Gly Tyr Val Val  
 Asp Lys Leu Glu Gly Thr Thr  
 260 265  
 270  
 Phe Arg Val Leu Arg Gly Phe Ser Glu  
 Leu Asp Phe Gly His Glu Phe  
 275 280  
 285  
 Tyr Ala Pro Gln Val Ala Val Asn Gly  
 Ser Asp Ala Trp Leu Val Gly  
 290 295  
 300  
 Trp Met Gly Leu Pro Ala Gln Asp Asp  
 His Pro Thr Val Ala Gln Glu  
 305 310  
 315 50 320

27  
 Gly Trp Val His Cys Leu Thr Val Pro  
 Arg Lys Leu His Leu Arg Asn  
 325  
 330  
 His Ala Ile Tyr Gln Glu Leu Leu Leu  
 Pro Glu Gly Glu Ser Gly Val  
 340  
 350  
 Ile Arg Ser Val Leu Gly Ser Glu Pro  
 Val Arg Val Asp Ile Arg Gly  
 355  
 360  
 365  
 Asn Ile Ser Leu Glu Trp Asp Gly Val  
 Arg Leu Ser Val Asp Arg Asp  
 370  
 375  
 380  
 Gly Asp Arg Arg Val Ala Glu Val Lys  
 Pro Gly Glu Leu Val Ile Ala  
 385  
 390  
 395  
 Asp Asp Asn Thr Ala Ile Glu Ile Thr  
 Ala Gly Asp Gly Gln Val Ser  
 400  
 405  
 410  
 Phe Ala Phe Pro Gly Leu Gln Arg  
 415  
 420

フロントページの続き

(51)Int. Cl.<sup>6</sup>

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:15)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

(72)発明者 土屋 誠

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 松井 裕

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社中央研究所内

\* (72)発明者 吉原 康彦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社生産技術研究所内

40 (72)発明者 中松 亘

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の  
素株式会社生産技術研究所内

\*



